

学位論文の要旨

Genome-wide association study of IgA nephropathy using
23 465 microsatellite markers in a Japanese population.
(マイクロサテライト法による IgA 腎症感受性遺伝子の
ゲノムワイド探索)

October, 2020

(2020 年 10 月)

Sanae Saka

坂 早苗

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 病態制御内科学

(Doctoral Sub-supervisor : Nobuhito Hirawa, Associate Professor)

(研究指導教員：平和 伸仁 准教授)

(Doctoral Supervisor : Koichi Tamura, Professor)

(指導教員：田村 功一 教授)

学位論文の要旨

Genome-wide association study of IgA nephropathy using 23 465 microsatellite markers in a Japanese population.

(マイクロサテライト法による IgA 腎症感受性遺伝子のゲノムワイド探索)

<https://www.nature.com/articles/jhg201588>

1. 序論

慢性糸球体腎炎は、本邦における透析導入の原因疾患の第2位である。慢性糸球体腎炎の40～60%をIgA腎症が占めており、その適切な治療を行うことで、末期腎不全に至り透析導入を要するIgA腎症患者を減少させることが期待される。

IgA腎症は腎生検検体で主にメサングウムにIgAが沈着する疾患として、1968年Bergerらによって初めて報告された(Berger and Hinglais, 1968)。当初は予後良好な疾患と考えられていたが、その後1993年にはフランスから、1997年には本邦から長期予後が発表され、診断から20年後にはそれぞれ37.8%、39.0%が末期腎不全に至ると報告された(Chauveau D, 1993 および Koyama A, 1997)。IgA腎症は、10～30歳代に多く発症し、アジア人に多い。一次性糸球体疾患のなかでは最も頻度が高く、システマティックレビューによると10万例に2.5例/年、あるいは東アジアで40%、ヨーロッパで20%、北米で2～10%と報告されている。有病率も東アジアで高く、ヨーロッパやアメリカで中等度、アフリカの順に低下する。これらの有病率の違いは、国際共同で行われたゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study: GWAS)によって、遺伝的背景をもとに地域差を説明し得ることが示された(Gharavi AG, 2011)。IgA腎症リスク対立遺伝子の頻度は、アジア系、ヨーロッパ系、アフリカ系の集団間にみられる有病率の差とほぼ一致していること、特にリスク効果の大きい対立遺伝子ほど地域間で差があることが報告された。このように、IgA腎症の発症は発症頻度の地域差・人種差を認めること、IgA腎症による腎不全患者の血縁腎移植ドナーの約30%に糸球体IgA沈着が観察されること、家族内集積例の存在や一卵性双生児での一致率などから、遺伝的要因と後天的環境要因の両者が原因と考えられている。

IgA腎症に対して行われたGWASにより、現在までにヒト白血球型抗原(HLA)領域、補体H因子(complement factor H: CHF)および関連蛋白、HORMAD2, TNFSF13など、様々な遺伝子座が同定された。MHC領域の遺伝子との関連から本症の病因に獲得免疫が関与することが示唆され、CFH領域との関連は補体活性との関連、HORMAD2は血清IgA腎症や炎症性腸疾患との関連だけでなく、B細胞に発現するleukemia inhibitory factor (LIF)とoncostatin M (OSM)のサイトカインの遺伝子領域を含み、本症病因と粘膜免疫との関連などが示された(Imielinski M, et al. 2009)。更に大規模な国際共同研究のGWASでも、

これまで同定された座位の感受性が再現された (Kiryluk K, et al. 2014). これ以前にも候補遺伝子アプローチあるいはゲノムワイドアプローチで疾患関連遺伝子の探索が行われてきたが特定の遺伝子の同定は困難であった. その原因として, 関連する多型が実際に疾患の発症・進展に寄与する程度が低い, もしくは, 集団中でのアリル頻度が低いため真の関連多型をまだ見出せていない可能性が考えられ, common-disease-rare variant 仮説として近年注目されている. 後者である場合, その多型は比較的新しく, 複数の祖先から発生している. そもそも SNP は変異速度がマイクロサテライト多型に比較して遅く, その頻度が集団中で高い場合, その SNP が発生した年代は古いと考えられる.

このような, 疾患への効果が強く頻度が低い真の関連多型を検出する方策については結論が出ていないのが現況である. その背景には, 集団中で頻度が低い多型はゲノムワイドレベルではそのカタログ化ができておらず, 検出するためには大規模な re-sequencing を必要とする状況がある. 一方, マイクロサテライトは変異速度が速く, 多型が豊富であるため, 近年発生した疾患感受性アリルが検出可能であり, SNP 解析では同定できない感受性遺伝子を検出できると推定される. そこで我々はマイクロサテライト法を用いて GWAS を行い, 疾患感受性遺伝子の同定を試みた.

本研究の目的は, 世界で初めてゲノムワイドに設定した約 2 万個のマイクロサテライトマーカーを用いて GWAS を行い, より検出力の強いゲノムワイド相関解析によって IgA 腎症の疾患感受性遺伝子の同定を行うことである.

2. 実験材料と方法

腎生検にて確定診断された日本人の成人 IgA 腎症患者 450 名, 健常者 450 名を対象に, 全ゲノムに配置した 23,465 のマイクロサテライトマーカーに対し Pooled DNA 法を用いて 3 段階のスクリーニング, 個別タイピングを行った. 更に, 個別タイピングで陽性になった領域のうち, 2 つの領域について新たなマイクロサテライトマーカーを設定して更に個別タイピングを行い, 疾患感受性遺伝子座の絞り込みを行った (施設名記入[横浜市立大学]倫理委員会承認番号 A100128006 延長申請承認番号 A150122019).

3. 結果

全ゲノムに配置した 23,465 のマイクロサテライトマーカーに対し Pooled DNA 法を用いて 3 段階のスクリーニングを行い, マイクロサテライトマーカーの数は, 1st スクリーニングで 23,465 マーカーから 2612 マーカー, 2nd スクリーニングで 2612 マーカーから 521 マーカー, 3rd スクリーニングで 521 マーカーから 210 マーカー, 対立遺伝子頻度が完全に

同一のマーカーであるかを確認し対立遺伝子頻度が同一のものに絞り込むことで最終的に、14 の陽性マーカーが得られた

pooled DNA のタイピング結果はそれぞれの個体を総計した推定であるため、3 段階スクリーニング手順で陽性となった 14 マーカーについて 900 検体での個別タイピングによる再分析を行い、陽性マーカーの数を 14 遺伝子座から 11 遺伝子座に更に絞り込んだ

個別タイピングで陽性になった領域のうち、HLA および TSPAN8 遺伝子(Hirukawa T, et al. 2014)、それぞれ 6p21 および 12q21 の 2 つの遺伝子座について、さらなる分析を行った。

6p21 および 12q21 の領域に 12 個の新しいマイクロサテライトマーカーを設定し、これらの 12 個の新規マイクロサテライトマーカーに対して individual typing 行った。6p21 の領域においては、8 つの新規マーカーのうち 6 つのマーカーで、12q21 の領域においては、4 つの新規マイクロサテライトマーカーのうち 3 つのマーカーで対立遺伝子頻度の有意差を示した。

4. 考察

本研究における染色体 6p21 上の HLA 領域での、これら新規マイクロサテライトマーカーとの関連についての分析を行うことで、この領域内の感受性遺伝子座の存在が示唆された。最も強く関連するマイクロサテライトマーカーである D6S2913 は、HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DQA1, および HLA-DQB1 の近傍にマッピングされたものであり、疾患感受性遺伝子座の重要な領域である可能性が示された。もう一つの領域である遺伝子座 12q21 も同様に、TSPAN8 および PTPRR 遺伝子領域の周囲に感受性領域があることが示唆された。

先に述べた Common disease-rare variant 仮説から、これまで特定することが困難であった疾患感受性アリルならびに関連遺伝子が、マイクロサテライトで絞り込んだ領域に対しての re-sequencing で新たに発見される可能性が高いと考えられる。

IgA 腎症の病態解明と新たな治療ターゲットの発見に向けて、マイクロサテライトを用いた GWAS を行ったので考察を含めて報告する。

引用文献

Berger J, Hinglais N. (1968) Intercapillary deposits of IgA-IgG. *J Urol Nephrol*, 74(9):694-5.

Chauveau D, Droz D. (1993) Follow-up evaluation of the first patients with IgA nephropathy described at Necker Hospital. *Contrib Nephrol*, 104:1-5.

Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, Sanna-Cherchi S, Men CJ, Julian BA, Wyatt RJ, Novak J, He JC, Wang H, Lv J, Zhu L, Wang W, Wang Z, Yasuno K, Gunel M, Mane S, Umlauf S, Tikhonova I, Beerman I, Savoldi S, Magistroni R, Ghiggeri GM, Bodria M, Lugani F, Ravani P, Ponticelli C, Allegri L, Boscutti G, Frasca G, Amore A, Peruzzi L, Coppo R, Izzi C, Viola BF, Prati E, Salvadori M, Mignani R, Gesualdo L, Bertinetto F, Mesiano P, Amoroso A, Scolari F, Chen N, Zhang H, Lifton RP. (2011) Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*, 13;43(4):321-7

Hirukawa T, Wu Q1, Sawada K, Matsusaka T, Saka S, Oka A, Hirawa N, Umemura S, Kakuta T, Endoh M, Inoko H, Ichikawa I, Fukagawa M. (2014) Kidney Diseases Enhance Expression of Tetraspanin-8: A Possible Protective Effect against Tubular Injury. *Nephron Extra*. 4, 70-81.

Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, Russell RK, Annese V, Dubinsky M, Kugathasan S, Bradfield JP, Walters TD, Sleiman P, Kim CE, Muise A, Wang K, Glessner JT, Saeed S, Zhang H, Frackelton EC, Hou C, Flory JH, Otieno G, Chiavacci RM, Grundmeier R, Castro M, Latiano A, Dallapiccola B, Stempak J, Abrams DJ, Taylor K, McGovern D; Western Regional Alliance for Pediatric IBD, Silber G, Wrobel I, Quiros A; International IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmuda MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J,

Bumpstead S, Gwillam R, Tremelling M, Delukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ, Heyman MB, Ferry GD, Kirschner B, Lee J, Essers J, Grand R, Stephens M, Levine A, Piccoli D, Van Limbergen J, Cucchiara S, Monos DS, Guthery SL, Denson L, Wilson DC, Grant SF, Daly M, Silverberg MS, Satsangi J, Hakonarson H. (2009) Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet*, 41(12):1335-40

Kiryluk K, Li Y, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Choi M, Verbitsky M, Fasel D, Lata S, Prakash S, Shapiro S, Fischman C, Snyder HJ, Appel G, Izzi C, Viola BF, Dallera N, Del Vecchio L, Barlassina C, Salvi E, Bertinetto FE, Amoroso A, Savoldi S, Rocchietti M, Amore A, Peruzzi L, Coppo R, Salvadori M, Ravani P, Magistroni R, Ghiggeri GM, Caridi G, Bodria M, Lugani F, Allegri L, Delsante M, Maiorana M, Magnano A, Frasca G, Boer E, Boscutti G, Ponticelli C, Mignani R, Marcantoni C, Di Landro D, Santoro D, Pani A, Polci R, Feriozzi S, Chicca S, Galliani M, Gigante M, Gesualdo L, Zamboli P, Battaglia GG, Garozzo M, Maixnerová D, Tesar V, Eitner F, Rauen T, Floege J, Kovacs T, Nagy J, Mucha K, Pączek L, Zaniw M, Mizerska-Wasiak M, Roszkowska-Blaim M, Pawlaczyk K, Gale D, Barratt J, Thibaudin L, Berthoux F, Canaud G, Boland A, Metzger M, Panzer U, Suzuki H, Goto S, Narita I, Caliskan Y, Xie J, Hou P, Chen N, Zhang H, Wyatt RJ, Novak J, Julian BA, Feehally J, Stengel B, Cusi D, Lifton RP, Gharavi AG. (2014) Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet*. 46(11):1187-96.

Koyama A, Igarashi M, Kobayashi M. (1997) Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy in Japan. Research Group on Progressive Renal Diseases. *Am J Kidney Dis*, 29(4):526-32.

論文目録

I 主論文

Genome-wide association study of IgA nephropathy using 23 465 microsatellite markers in a Japanese population

Sanae Saka, Nobuhito Hirawa, Akira Oka, Keisuke Yatsu, Takeshi Hirukawa, Ryohei Yamamoto, Taiji Matsusaka, Enyu Imai, Ichiei Narita, Masayuki Endoh, Iekuni Ichikawa, Satoshi Umemura and Hidetoshi Inoko

雑誌名 : *Journal of Human Genetics*, Vol. 60, No. 10, Page 573-80, 2015

II 副論文

該当論文なし

III 参考論文

Kidney Diseases Enhance Expression of Tetraspanin-8: A Possible Protective Effect against Tubular Injury.

Hirukawa T, Wu Q, Sawada K, Matsusaka T, Saka S, Oka A, Hirawa N, Umemura S, Kakuta T, Endoh M, Inoko H, Ichikawa I, Fukagawa M

雑誌名 : *Nephron Extra*, Vol. 30, No 4(1), Page 70-81, 2014

Reduced secretion of parathyroid hormone and hypocalcemia in systemic heterozygous ATP2B1-null hypertensive mice.

Ehara Y, Hirawa N, Sumida K, Fujiwara A, Kagimoto M, Ooki-Okuyama Y, Fujita M, Katsumata M, Kobayashi Y, Saka S, Katou I, Yatsu K, Umemura S, Tamura K.

雑誌名 : *Hypertens Res*. Vol.41, No.9, Page 699-707, 2018

Atherosclerosis of the carotid bulb is associated with the severity of orthostatic hypotension in non-diabetic adult patients: a cross-sectional study.

Kobayashi Y, Ishiguro H, Fujikawa T, Kobayashi H, Sumida K, Kagimoto M, Okuyama Y, Ehara Y, Katsumata M, Fujita M, Fujiwara A, Saka S, Yatsu K, Hirawa N, Toya Y, Yasuda G, Umemura S, Tamura K.

雑誌名 : *Clin Exp Hypertens*. Vol.19, Page1-8, 2018.

The effects of anti-hypertensive drugs and the mechanism of hypertension in vascular smooth muscle cell-specific ATP2B1 knockout mice.

Okuyama Y, Hirawa N, Fujita M, Fujiwara A, Ehara Y, Yatsu K, Sumida K, Kagimoto M, Katsumata M, Kobayashi Y, Saka S, Umemura S, Tamura K.

雑誌名 : *Hypertens Res*. Vol.41, No.2, Page 80-87, 2018.

Effects of tolvaptan in patients with chronic kidney disease and chronic heart failure.

Katsumata M, Hirawa N, Sumida K, Kagimoto M, Ehara Y, Okuyama Y, Fujita M, Fujiwara A, Kobayashi M, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Saka S, Yatsu K, Fujikawa T, Toya Y, Yasuda G, Tamura K, Umemura S.

雑誌名 : *Clin Exp Nephrol*. Vol.21, No.5, Page858-865, 2017

Effects of doxazosin as the third agent on morning hypertension and position-related blood pressure changes in diabetic patients with chronic kidney disease.

Yasuda G, Saka S, Ando D, Hirawa N.

雑誌名 : *Clin Exp Hypertens*. Vol.37, No.1, 75-81, 2015

Impaired nitric oxide production and increased blood pressure in systemic heterozygous ATP2B1 null mice.

Fujiwara A, Hirawa N, Fujita M, Kobayashi Y, Okuyama Y, Yatsu K, Katsumata M, Yamamoto Y, Ichihara N, Saka S, Toya Y, Yasuda G, Goshima Y, Tabara Y, Miki T, Ueshima H, Ishikawa Y, Umemura S.

雑誌名 : *J Hypertens*. Vol.32, No.7, Page1415-23, 2014

Efficacy of cyclosporine combination therapy for new-onset minimal change nephrotic syndrome in adults.

Fujiwara A, Hirawa N, Kobayashi Y, Yatsu K, Katsumata M, Ehara Y, Okuyama Y, Yutoh J, Kaneda T, Fujita M, Yamamoto Y, Saka S, Toya Y, Yasuda G, Umemura S.

雑誌名 : *Clin Exp Nephrol*. Vol.19, No.2, Page240-6, 2015

Mice lacking hypertension candidate gene ATP2B1 in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation.

Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, Miyazaki N, Fujiwara A, Ichikawa Y, Yamamoto Y, Ichihara N, Saka S, Wakui H, Yoshida S, Yatsu K, Toya Y, Yasuda G, Kohara K, Kita Y, Takei K, Goshima Y, Ishikawa Y, Ueshima H, Miki T, Umemura S.

雑誌名 : *Hypertension*. Vol.59, No.4, Page854-60, 2012

Long-term efficacy and safety of the small-sized β 2-microglobulin adsorption column for dialysis-related amyloidosis.

Yamamoto Y, Hirawa N, Yamaguchi S, Ogawa N, Takeda H, Shibuya K, Kawahara K, Kojima H, Dobashi Y, Fujita M, Azusima K, Miyazaki N, Kobayashi M, Kobayashi C, Fujiwara A, Yuto J, Saka S, Yatsu K, Toya Y, Yasuda G, Ohnishi T, Umemura S.

雑誌名 : *Ther Apher Dial*. Vol.15, No.5, Page466-74, 2011

Silent brain infarction and rapid decline of kidney function in patients with CKD: a prospective cohort study.

Kobayashi M, Hirawa N, Morita S, Yatsu K, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Saka S, Toya Y, Yasuda G, Umemura S.

雑誌名 : *Am J Kidney Dis*. Vol.56, No.3), Page468-76, 2010

Loss of nocturnal decline of blood pressure in non-diabetic patients with nephrotic syndrome in the early and middle stages of chronic kidney disease.

Andoh D, Kobayashi M, Yasuda G, Hirawa N, Saka S, Yatsu K, Yamamoto Y, Umemura S.

雑誌名 : *Hypertens Res*. Vol.32, No.5, Page364-8, 2009

Relationship between silent brain infarction and chronic kidney disease.

Kobayashi M, Hirawa N, Yatsu K, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Saka S, Andoh D, Toya Y, Yasuda G, Umemura S.

雑誌名 : *Nephrol Dial Transplant*. Vol. 24, No.1, Page201-7, 2009